

Notice on Plankton Seminar
#10021

13:30-15:30, 22 Nov. (Mon.) 2010 at Room #N407

Wichels, A., C. Hummert, M. Elbrucher, B. Luckas, C. Schutt and G. Gerds (2004)
Bacterial diversity in toxic *Alexandrium tamarensis* blooms
off the Orkney Isles and the Firth of Forth
Helgol. Mar. Res. **58**: 93-103.

英国スコットランド東部に位置するオークニー諸島沖およびフォース湾の
有毒 *Alexandrium tamarensis* ブルーム時における細菌群集の多様性

有毒藻類ブルームを形成する渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarensis* は、強力な神経毒を生産し、二枚貝を中心とする麻痺性貝毒発生の原因種として世界中で認識されている。ブルームの発生要因として多くの環境条件が考えられるが、微細藻類の増殖および毒性を制御する要因として、細菌との相互作用が注目されている。*A. tamarensis* と関係のある細菌としては、*Roseobacter* 属、*Alteromonas* 属、*Pseudoalteromonas* 属が知られているが、これらは藻類の培養株を用いて得られた成果であり、実際に現場海水中の細菌群集を調べた知見は少ない。本研究は、*A. tamarensis* ブルーム時の海水中に存在する細菌群集の遺伝的多様性を解析し、細菌群集と藻類ブルームとの関係を明らかにすることを目的とした。

試料の採集は1998年と1999年の5月から6月に、東部スコットランド沖で行われた。1998年は、*A. tamarensis* ブルームが発生していた2海域 (DE1: フォース湾南東部、DE2: オークニー諸島南東部) で漂流実験を行い、漂流ブイを投入し、それに沿って調査船を走行させ、それぞれ11地点および15地点から採水した。さらにオークニー諸島北西部に4地点設け、採水を行った。DE1およびDE2での採水試料は、ルゴールで固定し、顕微鏡による *A. tamarensis* 細胞の直接計数に用いた。試料は水深2~5 m からロゼットサンプラーを用いて採水し、同時に水温および塩分を測定した。1999年はフォース湾からオークニー諸島北西部までの425 km に及ぶライン上で29地点を設け、ポンプを用いて水深1~3 m から採水を行った。それぞれの試料を、孔径100 μm ナイロンメッシュで一次濾過を行い、大型プランクトンなどを取り除き、次に20 μm ナイロンガーゼで二次濾過を行い、フィルター上に渦鞭毛藻を濃縮した。20 μm ナイロンメッシュ上の濃縮物は、ゆるく付着するものを除くため、CTAB 溶液を含む滅菌海水で10回洗浄した。ガーゼは滅菌シャーレに移し、渦鞭毛藻の細胞はSTE緩衝溶液で洗浄回収後に凍結保存した。また、付着性細菌 (3 μm << 20 μm)、および浮遊性細菌 (0.2 μm << 3 μm) については、20 μm ナイロンスクリーンで一次濾過を行った後に、3 μm セルロースフィルターおよび0.22 μm カプセルフィルターで加圧濾過を行い、どちらのフィルターも凍結保存した。

細菌の分離を以下のように行った。20 μm ナイロンガーゼに捕集された微細藻類を滅菌海水に懸濁し、超音波処理の後に遠心処理を行い、藻類細胞片を取り除いた。上澄みを濾過し、Zobell 2216E 寒天培地に塗抹し、10°C、暗所の環境で2~4週間静置培養し、コロニー形成の後に単離した。そして、HPLC で試料の毒素を解析し、毒素生産の指標となるSCB (Sodium Channel Blocker) 毒性値をMNB (Mouse neuroblastoma) によって検出した。また、RNAの抽出を行った。細菌の16S rDNAの部分塩基配列をPCR法により増幅させ、PCR産物を用いてDGGE法によりバンドを形成させて解析を行った後に、バンドを切り出してDNA解析を行い、バンドの細菌を調べた。

DGGE法の結果より、1998年のDE1およびDE2の試料では、同地点内では一定の傾向がみられたが異なる細菌群集が確認され、これは2水域の水塊構造の相違が原因と考えられた。また、サイズ分画した試料の解析から、渦鞭毛藻画分の細菌、付着性細菌と浮遊性細菌が系統的に異なることが分かった。1999年のライン上で採集した試料から付着性細菌の多様性とPSP毒性値との間に相関はみられず、これ水塊構造の相違が起因していると考えられた。DGGE法のバンドDNA抽出の結果より、ProteobacteriaグループとBacteroidetesグループが優占しており、特に *A. tamarensis* ブルーム時の浮遊性・付着性細菌にはα-Proteobacteriaに属する *Roseobacter* 科の細菌が優占しており、過去の知見と一致した。Bacteroidetesは *A. tamarensis* 混菌培養株中から単離されたとの報告が多い細菌であるが、本研究では現場海水から単離され、既報のものとは遺伝的な相同性が低いため、別の特性を持つ細菌と考えられた。殺藻細菌としての報告がある株も存在することから、これらの細菌が微細藻類に対して何らかの悪影響を及ぼし、ブルームを終焉に導いている可能性が示唆された。

大西 由花